



#3

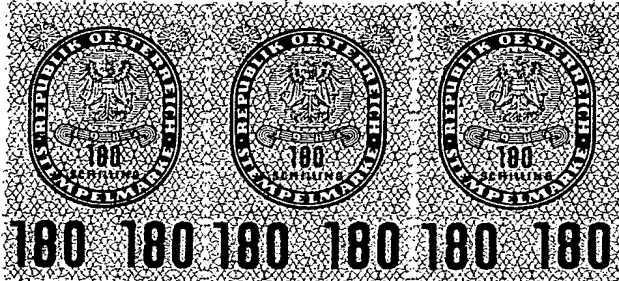
AT 99 / 271

ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

A-1014 WIEN, KOHLMARKT 8

REC'D 10 FEB 2000

WIPO PCT

Aktenzeichen **A 1873/98****PRIORITY DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Das Österreichische Patentamt bestätigt, dass

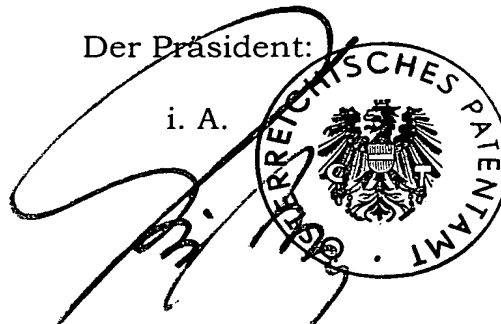
**die Firma IMMUNO Aktiengesellschaft
in A-1221 Wien, Industriestraße 67,**am **10. November 1998** eine Patentanmeldung betreffend**"Pharmazeutische Präparation enthaltend einen Rezeptor-Antagonisten
zur Behandlung von Blutgerinnungsstörungen",**überreicht hat und dass die beigeheftete Beschreibung samt Zeichnungen
mit der ursprünglichen, zugleich mit dieser Patentanmeldung überreichten
Beschreibung samt Zeichnungen übereinstimmt.

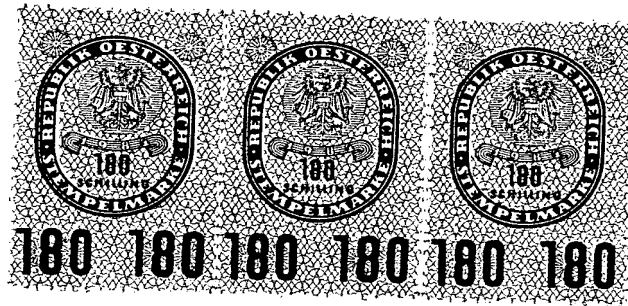
Österreichisches Patentamt

Wien, am 2. Dezember 1999

Der Präsident:

i. A.

**Kanzleirat FUHLINGER**
Fachoberinspektor



ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT
Verwaltungsstellen-Direktion

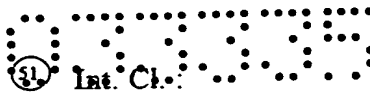
.....420-... S ...32,52... €

Kanzleigegebühr bezahlt.

Ballaun

A 1873/98 ● 1

PATENTANWÄLTE
SONN, PAWLOY, WEINZINGER
& WOLFRAM
A-1010 WIEN, RIEMERGASSE 14

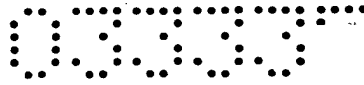


1826
Urtext

AT PATENTSCHRIFT

⑪ Nr.

- ⑦③ Patentinhaber: IMMUNO Aktiengesellschaft
Wien (AT)
- ⑤④ Gegenstand: Pharmazeutische Präparation enthaltend
einen Rezeptor-Antagonisten zur Behand-
lung von Blutgerinnungsstörungen
- ⑥① Zusatz zu Patent Nr.
- ⑥⑦ Umwandlung aus GM
- ⑥② Ausscheidung aus:
- ②② ②① Angemeldet am: 10. Nov. 1998
- ③③ ③② ③① Unionspriorität:
- ④② Beginn der Patentdauer:
Längste mögliche Dauer:
- ④⑤ Ausgegeben am:
- ⑦② Erfinder:
- ⑥① Abhängigkeit:
- ⑤⑥ Entgegenhaltungen, die für die Beurteilung der Patentierbarkeit in Betracht gezogen wurden:



Die Erfindung betrifft eine pharmazeutische Präparation auf Basis von Blutgerinnungsproteinen und Maßnahmen zur Verlängerung deren biologischen Halbwertszeit.

Therapeutische Proteine, insbesondere Präparationen zur Behandlung von Blutgerinnungsstörungen, welche Blutgerinnungsproteine, wie z.B. von Willebrand-Faktor (vWF), beinhalten, haben oft relativ kurze Halbwertszeiten im Organismus. Dadurch kann eine therapeutische Verabreichung solcher Präparationen innerhalb kurzer Zeit wirkungslos werden oder zumindest in ihrer Wirksamkeit stark beeinträchtigt werden.

Vieles an den physiologischen Abbauwegen von Blutgerinnungsproteinen ist ebenso unbekannt wie die genauen Faktoren, die deren Halbwertszeit im Körper bestimmen.

So ist lediglich bekannt, daß aktivierter Faktor VIII über seine A2-Domäne an das Lipoproteinrezeptor-verwandte Protein (lipoprotein receptor related protein; LRP) bindet, wobei diese Bindung sowohl für die Internalisierung von Faktor VIII als auch für dessen Abbau zuständig ist. Es ist auch bekannt, daß durch ein Rezeptor-assoziiertes Protein (RAP), einem Inhibitor von LRP, die Internalisierung der A2-Domäne von Faktor VIII gehemmt werden kann, wobei angenommen wird, daß die Dissoziation der A2-Untereinheit vom übrigen aktivierten Faktor VIII-Molekül reversibel ist.

Das "low density lipoprotein related protein" ist ein multifunktionell endozytotisch aktiver Rezeptor, der strukturell wie funktionell unterschiedliche Liganden bindet und endozytieren kann. RAP ("receptor-associated protein") inhibiert alle Interaktionen der Liganden mit LRP in vitro.

Prinzipiell wird vermutet, daß dieser Mechanismus von Bedeutung bei der Aktivitätsregulierung von Faktor VIIIa sein könnte (Blood 90 (10) Suppl. 1: 31a (1997)).

Es ist auch bekannt, daß LRP als Abbaurezeptor (Clearance receptor) für Gewebefibrinogenaktivator (tPA) fungieren kann,

d.h. für dessen Entfernung aus der Blutzirkulation verantwortlich ist. Weiters scheinen dabei auch weitere Rezeptoren, wie z.B. der Mannose-Rezeptor, von Bedeutung zu sein. Andererseits ist auch bekannt, daß LRP bei der Clearance von vielen verschiedenen Liganden, wie Proteinasen, Inhibitoren, deren Komplexe mit Proteinasen, sowie verschiedenen Lipoproteinen, beteiligt sein kann.

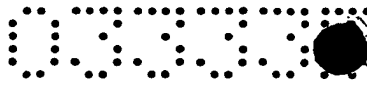
Es wurde gefunden, daß tPA eine sehr schnelle Clearance im Blutkreislauf erfährt, und daß Mutanten von tPA sowie Inhibitoren der Clearance dazu verwendet werden können, um die Dosierung von tPA bei der Thrombolysetherapie zu verringern (Fibrinolysis and Proteolysis (1997), S. 173-186).

In RAP-defizienten Mäusen konnte nachgewiesen werden, daß die Clearance von α_2 -Makroglobulin in der Leber gestört ist. Hierbei wurde auch nachgewiesen, daß die Menge von reifem prozessierten LRP sowohl in der Leber als auch im Gehirn reduziert ist (PNAS, 92 (1995), S. 4537-4541).

In der EP-0 713 881-A2 werden von Willebrand-Faktor (vWF)-Konzentrate in Kombination mit Antithrombolytika und/oder Fibrinolytika beschrieben. Zweck dieser Präparate ist die Verringerung der Blutungsrisiken bei einer Antikoagulationstherapie.

In der US 5 304 383 wird eine pharmazeutische Präparation, enthaltend lys-Plasminogen in Kombination mit einem Serinproteainhibitor, wie Aprotinin oder α_2 -Makroglobulin, beschrieben, welche zur Behandlung von Plasminogen-Mangel und Thrombosen eingesetzt werden kann.

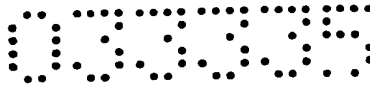
Die Erfindung stellt sich zur Aufgabe, eine pharmazeutische Präparation zur Verfügung zu stellen, auf Basis von einem Blutgerinnungsprotein, welches sich durch eine verbesserte in vivo Halbwertszeit auszeichnet. Die Erfindung stellt sich weiters zur Aufgabe, die in vivo Halbwertszeit eines Blutgerinnungsproteins zu verlängern, um einerseits den endogenen Gehalt an dem Blutgerinnungsprotein zu stabilisieren und andererseits die Effizienz von einem exogenen Blutgerinnungsprotein zu steigern.



Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch eine pharmazeutische Präparation zur Behandlung von Blutgerinnungsstörungen gelöst, welche Präparation mindestens ein Protein, ausgesucht aus der Gruppe von einem pro-Protein der Blutgerinnung enthält. Diese pharmazeutische Präparation ist weiters durch einen Gehalt an einem Rezeptor-Bindungskompetitor gekennzeichnet, welcher alleine gerinnungsphysiologisch inert ist, wie beispielsweise Lipoproteine. Dadurch wird die Wirkung des Proteins auf die Blutgerinnung nicht unmittelbar beeinflusst, der Rezeptor-Bindungskompetitor trägt lediglich zur Stabilisierung des Proteins in vivo bei.

Das Protein in der erfindungsgemäßen Präparation ist vorzugsweise ein Blutgerinnungsprotein, ausgesucht aus der Gruppe von Faktor II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, vWF und Protein C. Diese Proteine sind die Proformen von der gerinnungsphysiologisch wirksamen aktiven Form. Beispielsweise ist Faktor II (Prothrombin) die Proform des gerinnungsaktiven Thrombins, welches Fibrinogen zu Fibrin enzymatisch spaltet und damit ein Blutgerinnsel hervorruft. Zu diesen Proteinen zählen einerseits die Vitamin K-abhängigen Proteine, welche auch in einem Prothrombin-komplex-Präparat auf Basis der Faktoren II, IX und X und gegebenenfalls Faktor VII und Protein C vorkommen. Weiters ist ein mögliches Protein in der erfindungsgemäßen Präparation des vWF bzw. dessen analoge Proteine. vWF zeigt vor allem in Plättchenreichem Plasma seine Eigenständigkeit als Blutgerinnungsfaktor, unabhängig von seiner Rolle als Träger und Stabilisator des Faktor VIII (Beguin et al., Thrombosis and Haemostasis 78 (1), 590-594 (1997)). vWF wird beispielsweise aus Plasma oder einer Plasmafraktion gewonnen, kann aber auch durch rekombinante DNA-Technologie, durch Expression einer transformierten Zelle, hergestellt werden. Beispielsweise wird ein rekombinanter vWF nach der Vorschrift von Pannekoek (EP 0 197 592) bzw. Fischer et al. (WO 96/10584) hergestellt.

Auch die Gruppe der Blutgerinnungszymogene bzw. Vorstufen der gerinnungsphysiologisch aktiven Blutgerinnungsproteine sind einerseits aus Plasma oder einer Plasmafraktion erhältlich und entsprechen den nativen Proteinen. Andererseits können die nativen Proteine bzw. deren Derivate auch aus Zellkulturüberständen



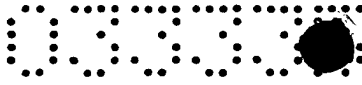
gewonnen werden. Die Zellen werden dabei vorzugsweise durch rekombinante DNA-Technologie transformiert, um die rekombinanten Formen der Blutgerinnungsproteine zu erhalten.

Mutanten bzw. Analoge sind insoweit in der erfindungsgemäßen Präparation enthalten, wie diese noch zur Behandlung von Blutgerinnungsstörungen eingesetzt werden können und an einen Rezeptor funktionell, also kompetitiv, binden können.

Als Rezeptor für die Proteine der erfindungsgemäßen Präparation ist vor allem der Lipoproteinrezeptor zu nennen bzw. LRP. Ein weiterer Rezeptor, an dem die Proteine binden, ist beispielsweise der Mannose-Rezeptor. Es hat sich erfindungsgemäß überraschenderweise herausgestellt, daß die Liganden des LRP vor allem für pro-Proteine der Blutgerinnung eine positive Wirkung in vivo zeigen, indem diese Liganden an den Rezeptor kompetitiv binden. Dies war insofern überraschend, da nicht vermutet werden konnte, daß pro-Proteine der Blutgerinnung und vWF an LRP binden können. LRP war vor allem zur Bindung von Enzymen bzw. deren Komplexe mit Inhibitoren bekannt. Durch die kompetitive Eigenschaft der Bindung an LRP wird die vorzeitige Bindung des Proteins in der pharmazeutischen Präparation bzw. des endogenen Blutgerinnungszymogens und vWF verhindert, wodurch dessen biologische Verfügbarkeit wesentlich verbessert wird.

Als Rezeptor-Bindungskompetitor können eine Reihe von Proteinen eingesetzt werden, wobei diejenigen bevorzugt sind, deren physiologische Toleranz geprüft ist.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist der Rezeptor-Bindungskompetitor ausgewählt aus der Gruppe der Enzyme, insbesondere Tissue-type Plasminogenaktivator (tPA), Urokinase (u-PA), pro-Urokinase (pro-u-PA), Lipoproteinlipase (LPL) und Kallikrein; Inhibitoren, insbesondere Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), Tissue factor pathway Inhibitor (TFPI) und Aprotinin; Enzym-Inhibitor-Komplexe, insbesondere t-PA-PAI-1, u-PA-PAI-1 und Thrombin-PAI-1, α_2 -Macroglobulin-Proteinase (fast form) α_2 M, α_2 M', Pregnancy zone protein-Proteinase, Elastase- α^1 -Antitrypsin, Thrombin-Antithrombin III, Thrombin-Heparin-Cofactor II und u-PA-Protease-Nexin I; Lipoproteine, insbesondere low density-Lipoprotein



(LDL), Apolipoprotein E angereichertes β -very low density-Lipoprotein, (apo E- β -VLDL), LPL angereichertes VLDL (LPL-VLDL) und LPL angereichertes β -VLDL (LPL- β -VLDL); Matrix-Proteine, insbesondere Thrombospondin 1 und 2; Toxine und Viren, insbesondere Pseudomonas Exotoxin A, und Minor-group human Rhinovirus; oder andere Liganden, insbesondere Apolipoprotein E (apo E), Lactoferrin, Rezeptor-assoziiertes Protein (RAP), FVIII und vWF.

Der kompetitiv wirkende Ligand ist vorzugsweise ausgewählt unter den physiologischen Proteinen, die vorzugsweise in der Zirkulation als (humanphysiologische) extrazelluläre Proteine auftreten. Diese können in nativer Form eingesetzt werden, oder als deren Analoge mit der Eigenschaft der Bindung an den Rezeptor.

Um die Wirkung der pharmazeutischen Präparation bzw. der endogenen Proteine nicht zu beeinträchtigen, ist der Rezeptor-Bindungskompetitor ausgewählt unter den gerinnungsphysiologisch inerten Proteinen, darunter beispielsweise "low density lipoprotein" (LDL) und Apolipoprotein.

Als gerinnungsphysiologisch inerte Rezeptor-Bindungskompetitor können auch Gemische dieser Rezeptor-Bindungskompetitoren eingesetzt werden, die eventuell nicht als einzelne Proteine, jedenfalls aber im Gemisch keinen unerwünschten Einfluß auf das Gerinnungssystem ausüben. Beispiele für solche Gemische sind Thrombin mit ATIII oder mit Heparin-Cofaktor II, oder mit Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), weiters auch Elastase und α_1 -Antitrypsin, tPA mit PAI-1. Beispielsweise ist ein bevorzugtes Gemisch tPA und Aprotinin, welches sich hervorragend zur Stabilisierung etwa des Faktor VIII in vivo eignet. Der gewählte Rezeptor-Bindungskompetitor ist hier also ein Ligand, dessen gerinnungsphysiologische Wirkung unterbunden ist, gegebenenfalls durch die Antagonisierung mit dem entsprechenden Inhibitor.

Anstelle eines Gemisches aus einem prinzipiell zwar wirksamen Rezeptor-Bindungskompetitor und einem geeigneten Antagonisten kann auch eine mutierte Form des Rezeptor-Bindungskompetitors verwendet werden, der durch geeignete Mutationen (z.B. im aktiven Zentrum) inaktiviert ist (dessen Affinität gegenüber dem Re-

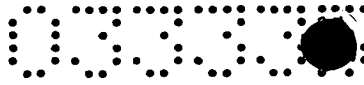
zeptor aber nicht wesentlich verändert (verringert) ist.) Beispiele hierfür sind u.a. mutierte Formen von tPA, Urokinase, Kallikrein, Renin, Thrombin (WO 96/41868) etc.

Es war überraschend, daß rekombinanter tPA (rtPA) den endogenen Faktor VIII-Gehalt in einem vWF-defizienten Hund über einen längeren Zeitraum stabilisierte, wodurch die Hämophilie behandelt werden konnte. Obwohl der natürliche Stabilisator des Faktor VIII, nämlich vWF, fehlte, konnte der LRP-Ligand bzw. das Gemisch der LRP-Liganden die Funktion des vWF übernehmen. Der Faktor VIII-Gehalt wurde um ca. 50 % erhöht und blieb bei diesem Niveau mehrere Tage. Das Enzym tPA ist ein bekannter Ligand des LRP. Die Verabreichung des rtPA an ein Säugetier blockiert also LRP und verhindert somit den metabolischen Abbau der Gerinnungsfaktoren, wie z.B. Faktor VIII. Dieser blockierende Effekt wird noch durch Aprotinin verstärkt. Der Effekt von Aprotinin alleine konnte auch in einem vWF-defizienten Hund gezeigt werden, der eine Kombination von rvWF und Aprotinin erhielt. Dadurch wurde wiederum eine Erhöhung des Faktor VIII-Gehaltes über einen längeren Zeitraum bewirkt.

Ein weiterer bevorzugter Rezeptor-Bindungscompetitor ist Aprotinin, welches sich hervorragend zur Stabilisierung des vWF eignet. Aprotinin kann beispielsweise nicht nur in einer vWF-Präparation zur verbesserten biologischen Verfügbarkeit beitragen, sondern auch, als einzelne Wirksubstanz verabreicht, zu verbesserten Zustand eines vWF-defizienten Patienten beitragen.

In vielen Fällen wird ein Patient mit einem Mangel an einem bestimmten Protein dann mit dem jeweiligen Rezeptor-Bindungscompetitor behandelt, um die Bildung des endogenen Proteins zu ermöglichen bzw. das Protein zu stabilisieren. Dies ist bei Patienten mit einem phänotypischen Gerinnungsproteinmangel möglich.

Das erfindungsgemäße Präparat bzw. die genannten Wirksubstanzen werden vorzugsweise als behandelte Präparate bzw. Proteine eingesetzt, um eine Übertragung von möglicherweise vorhandenen Pathogenen, wie Viren oder Prionen (TBE), auszuschließen. Bei der Gewinnung aus biologischen Materialien, wie Blut, Plasma, Plasmafraktionen oder Zellkulturen, existiert ein Risiko der Konta-



mination mit Humanpathogenen, das jedoch durch eine entsprechende Behandlung zur Inaktivierung bzw. Abreicherung eliminiert werden kann. Zu den effektiven Maßnahmen zur Inaktivierung von Viren zählen beispielsweise die Behandlung mit organischen Lösungsmitteln und/oder Detergenzien (EP-0 131 740, EP-0 050 061, virus inactivating eluent), die Behandlung mit chaotropen Mitteln (WO 90 15 613) Hitzebehandlungsverfahren, vorzugsweise in lyophilisiertem, trockenem oder feuchtem Zustand (siehe EP-0 159 311), Kombinationsverfahren wie das der (EP-0 519901) und physikalische Methoden. Letztere bewirken die Inaktivierung von Viren, beispielsweise durch Bestrahlung mit Licht, etwa in Gegenwart von Photosensibilisatoren (EP-0 471 794 und WO/AT 97/00068).

Zu dem Abreicherungsverfahren der Humanpathogene zählen insbesondere die Filtrationen unter Verwendung von Ultrafiltern, Tiefenfiltern oder Nanofiltern (A 341/98). Aber auch Fällungsschritte bzw. andere Proteinreinigungsmaßnahmen, wie die der Adsorption, tragen zur Abreicherung von möglicherweise vorhandenen Pathogenen bei.

Die erfindungsgemäße Präparation kann einerseits als fertige Formulierung, d.h. als Gemisch des Proteins mit dem Rezeptor-Bindungskompetitor zur Verfügung gestellt werden. Andererseits ist es auch möglich, ein Set zur Verfügung zu stellen, welches A) das Protein und B) den Rezeptor-Bindungskompetitor enthält. Das Set hat den Vorteil, daß die Dosis der einzelnen Komponenten variabel ist und die Form der Administration den vorliegenden Verhältnissen angepaßt werden kann. Beispielsweise ist neben der iv-Verabreichung auch die intramuskuläre, subkutane oder orale Verabreichung der Wirkstoffe möglich. Die Wirksubstanzen können gemeinsam, also simultan, aber auch parallel oder konsekutiv dem Patienten verabreicht werden. Bei Verwendung eines Sets ist die erfindungsgemäße Präparation vorzugsweise in Fertigspritzen mit den einzelnen Komponenten vorgefertigt.

Eine erfindungsgemäße Indikation für das Präparat ist beispielsweise eine Behandlung eines Patienten mit einem phänotypischen Gerinnungsfaktormangel, z.B. eines vWF-defizienten Patienten. Dabei wird erfindungsgemäß ein Präparat hergestellt auf Basis

des Gerinnungsfaktors, der im Patienten mangelhaft ist, mit der erfindungsgemäßen Kombination des Rezeptor-Bindungskompetitors. Aber auch der Rezeptor-Bindungskompetitor alleine entspricht der erfindungsgemäßen Indikation. Beispielsweise wird bei einem Mangel an funktionellem Faktor VIII der Rezeptor-Bindungskompetitor für Faktor VIII verabreicht, welcher eventuell das Gemisch tPA und Aprotinin ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung einer LRP-Ligandenpräparation zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung von phänotypischem Gerinnungsfaktormangel (z.B. vWF-, Faktor VIII- oder Faktor IX-Mangel) oder zur Verlängerung der biologischen Halbwertszeit eines Proteins.

Die Erfindung wird an Hand der nachfolgenden Beispiele und der Zeichnungen, auf die sie jedoch nicht beschränkt sein soll, näher erläutert.

Es zeigen:

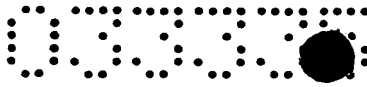
Fig. 1: Faktor VIII-Bestimmung im vWF-defizienten Hund

Fig. 2: vWF und Faktor VIII-Bestimmung in vWF-defizientem Hund

B e i s p i e l e :

B e i s p i e l 1 :

Ein Kooiker Hund mit schwerem von Willebrand Faktor-Mangel vom Typ 3 (Rieger et al., Thromb. Haemost. (1998), 80: 332-337) männlichen Geschlechts, 8,5 kg Körpergewicht, 2 Jahre alt, wurde mit 10 mg/kg Körpergewicht Ketamin (Ketasol, Dr. E. Gräub AG, Bern, Schweiz) und 1 mg/kg Xylaxin (Xylasol, Dr. E. Gräub AG, Bern, Schweiz) narkotisiert. Anschließend wurde ein permanenter venöser Zugang über einen Unterarm geschaffen und über eine Kanüle Aprotinin (Pantanol 100.000 K.I.E. Ampullen, Gerot Pharmazeutika, Wien) in einer Dosis von 10 000 K.I.E. pro kg Körpergewicht als Bolus verabreicht. Anschließend wurde rekombinanter Gewebefibrinogenaktivator (Actilyse, Boehringer Mannheim) (rtPA) gemäß Herstellerangabe mit destilliertem Wasser rekonsti-



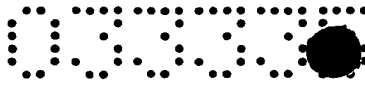
tuiert und dem von Willebrand-defizienten Hund in einer Dosis von 0,25 mg/kg Körpergewicht als Bolus verabreicht. Gleichzeitig wurde eine Blutprobe auf Zitrat entnommen. Innerhalb der ersten Stunde der Behandlung wurde eine Coinfusion von Aprotinin (3000 K.I.E. pro kg Körpergewicht) und rtPA 0,75 mg/kg Körpergewicht verabreicht und nach einer Stunde wurde auf eine Infusion gewechselt, die Aprotinin in einer Dosis von 3000 K.I.E. pro kg Körpergewicht und rtPA von 0,5 mg/kg Körpergewicht enthielt, und diese über eine Stunde verabreicht. Anschließend, d.h. nach zwei Stunden, wurde über eine weitere Stunde Aprotinin in einer Dosis von 3000 K.I.E./kg Körpergewicht infundiert. Zu den Zeitpunkten 30 min, 1, 3, 24, 48, 92 und 96 Stunden nach Versuchsbeginn wurden Blutproben auf Zitrat abgenommen und durch Zentrifugation daraus plättchenarmes Plasma hergestellt und bei -20°C tiefgefroren und bis zur weiteren Analyse gelagert.

In den gefrorenen Blutproben wurde nach Abschluß des Infusions-experimentes Blutgerinnungsfaktor VIII mit zwei unterschiedlichen Bestimmungsmethoden quantitativ bestimmt. Erstens wurde die Zweistufengerinnungsmethode gemäß der Methode von Austen, D.E.G. und Rhymes, I.L., A Laboratory Manual of Blood Coagulation, Oxford, UK, Blackwell Scientific, (1975), unter Verwendung der Reagentien des Zweistufen-Faktor VIII - Test-Kits der IMMUNO AG, Wien, verwendet. Zweitens wurde Faktor VIII mit dem chromogenen Faktor VIII-Test-Kit, Immunochrom FVIII:C der Immuno AG, Wien, bestimmt (Lang H., Oberreiter M., Moritz, B. Thromb. Haemost. 65:943, (1991)). Faktor VIII wurde gegen einen humanen Plasma Faktor VIII-Standard, der gegen den dritten internationalen Standard 91/666 kalibriert worden war, gemessen. Die Faktor VIII-Aktivität wird in humanen Faktor VIII-Einheiten pro ml ausgedrückt. Das Resultat dieser Bestimmung ist in der Fig. 1 zusammengefaßt. In den beiden unabhängig voneinander durchgeführten Faktor VIII-Bestimmungsmethoden zeigte sich ein Anstieg der Faktor VIII-Plasmaaktivität, der über einen Zeitraum von 24 bis 48 Stunden anhielt und anschließend auf einem Niveau von ca. 150 % des Ausgangswertes, unabhängig von der verwendeten Testmethode, über einen Zeitraum bis zu 96 Stunden nach Versuchsbeginn konstant blieb. Da bekannt ist, daß von Willebrand-Faktor gegen den proteolytischen Abbau durch Plasmin empfindlich ist, mußte angenommen werden, daß die Gabe von rtPA eine vermehrte von

Willebrand-Faktor-Inaktivierung, verbunden mit einer sekundären Reduktion des Plasma-Faktor VIII-Spiegels durch Fehlen des Stabilisierungsproteins für Faktor VIII zu finden sein wird. Die gleichzeitige Gabe von Aprotinin als Inhibitor der Fibrinolyse und des Plasmins ließ lediglich eine Inhibition des rtPA-Effektes erwarten. Der scheinbar paradoxe Anstieg des Plasma-Faktor VIII-Levels kann daher durch die Interferenz von Aprotinin und/oder rtPA mit den Metabolisierungsmechanismen für Faktor VIII erklärt werden.

B e i s p i e l 2 :

Ein von von Willebrand-Faktor-defizienter Hund wie in Beispiel 1 wurde narkotisiert und anschließend mit Aprotinin (Pantanol) mit einer Dosis von 100.000 K.I.E. als intravenöser Bolus vorbehandelt. Anschließend wurde dem Tier ein rekombinantes von Willebrand-Faktor-Präparat in einer Dosis von 70 RcoF E/kg gegeben. Die Herstellung und Charakterisierung des rekombinanten von Willebrand-Faktor-Präparates ist in Fischer et al., FEBS Lett. 375:259 (1995), beschrieben. Unmittelbar nach der Gabe des rekombinanten von Willebrand-Faktor-Präparates wurde über drei Stunden eine Infusion von 100.000 K.I.E. Aprotinin intravenös verabreicht. Blutproben auf Ziträt wurden vor Beginn des Versuches (= Zeitpunkt 0) 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 24 h und 48 h nach der Behandlung mit rekombinatem von Willebrand-Faktor entnommen und daraus Plasma, wie in Beispiel 1 beschrieben, hergestellt und bis zur weiteren Analyse bei -20°C tiefgefroren. Von diesen Blutproben wurde anschließend von Willebrand-Faktor-Antigen unter Verwendung eines Kaninchen Anti-Human-von Willebrand-Faktor-Antikörpers mit dem Test Asserachrom vWF, Boehringer Mannheim, gemessen. Außerdem wurde die Ristocetin-Cofaktor-Aktivität, gemessen durch Ristocetin induzierte Aggregation Formaldehyd-fixierter humaner Blutplättchen und nach der Methode von Evans und Austen, Brit. J. Hetamol. 37:289 (1977) bestimmt. Als von Willebrand-Faktor-Standard diente ein humaner Plasma-Standard. Außerdem wurde Faktor VIII, wie in Beispiel 1 beschrieben, getestet. Die Resultate der Bestimmung der Blutproben an von Willebrand-Faktor und Faktor VIII-Aktivität sind der Fig. 2 zu entnehmen. In der Grafik ist ein Mittelwert der Faktor VIII-Aktivität, gemessen nach den beiden Faktor VIII-Bestimmungsmetho-



den, als Graph eingezeichnet. Von Willebrand-Faktor wurde, wie aus der Literatur bekannt (Turecek et al., Blood 90: 3555 (1997)), mit einer Halbwertszeiten von 10 bis 20 h eliminiert, so daß nach 48 h kaum mehr von Willebrand-Faktor in der Zirkulation nachweisbar war. Gleichzeitig mit Gabe des rekombinanten von Willebrand-Faktors und des Aprotinins stieg der Plasma-Faktor VIII-Spiegel innerhalb von 3 h auf ca. 150 % des Ausgangswertes an und blieb dann auf diesem Niveau stabil oder zeigte sogar einen leicht steigenden Trend bis zu 48 h nach der Verabreichung. Auch dieses Ergebnis kann wie Beispiel 1 interpretiert werden, daß durch die Gabe des Aprotinins trotz fehlender Stabilisierung des Faktor VIII durch den rekombinanten von Willebrand-Faktor, durch eine Interferenz mit dem Faktor VIII-Metabolismus der Faktor VIII-Plasma-Spiegel anhaltend erhöht bleibt.

B e i s p i e l 3 :

The effect of RAP on the factor VIII recovery in knock-out mice with severe factor VIII-deficiency

A genetically engineered mouse strain with severe factor VIII (FVIII)-deficiency was made by targeted disruption of the mouse factor VIII-gene, according to Bi et al., Nature Genetics 10:119-121 (1995). Factor VIII knock-out mice were created by an insertion of a neo-gene into the 3'-end of exon 17 of the mouse factor VIII-gene. The affected males (X'Y) had undetectable factor VIII-levels of $<0.02 \pm 0.01$ U/ml when measured either with a chromogenic factor VIII assay, Hyland Immuno, Vienna, Austria, as described recently (Turecek et al., Thromb. Haemostas. Suppl. 769 ((1997) or by antigen ELISA as described below.

Two hemizygous affected male mice (X'Y) were treated with a recombinant human factor VIII (rhFVIII) preparation derived from Chinese hamster ovary cells produced as described (PCT WO/85/01961) and pharmaceutically formulated without any stabilizing protein at a dose of 200 U/kg body weight given intravenously.

Under anesthesia, one hour after treatment, the tail tips of the mice were cut by a scalpel blade as described by Novak et al., Brit. J. Haematol. 69:371-378 (1998). A volume of 50 μ l blood was collected from the tail wounds with capillaries (Ringcaps, Hirschmann, Germany), which capillaries were coated with lithium heparin as anti-coagulant. The capillaries were closed and centrifuged to separate blood cells from plasma. Subsequently the capillaries were opened and the cell and the plasma fraction were collected by further centrifugation. Finally, the plasma samples were applied to factor VIII determination by the factor VIII antigen ELISA, test kit IMMUNOZYM FVIII Ag, Hyland Immuno, Vienna, Austria, using monoclonal antifactor VIII antibodies both for capture and detection as described (Steel et al., Nature 303:530-532 (1983); Lenting et al., J. Biol. Chem. 269:7150-7155 (1994); Leyte et al., Biochem. J. 263:187-194 (1989). The resulting factor VIII-values were expressed in international units of human factor VIII. The results of factor VIII plasma levels are outlined in the table.

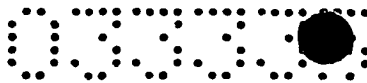
Two other hemizygous affected male mice (X'Y) were pretreated with recombinant receptor associated protein (GST-RAP) 10 minutes prior to the treatment with the recombinant human factor VIII, at a dose of 40 mg/kg body weight. The receptor related protein (RAP) used in this study, which interacts with the low density lipoprotein receptor, was obtained by bacterial fermentation as described by Hertz et al., J. Biol. Chem. 266:21232-21238 (1991). A fusion protein of the RAP with glutathione S-transferase was expressed in an E.coli and purified by affinity chromatography on glutathione agarose. The resulting protein mainly consisted of the fusion protein and split products of RAP and glutathione S-transferase. The fusion protein was formulated in an injectable buffer ready for administration to the factor VIII knock-out mice. As in the control group (treatment with factor VIII alone), blood samples were obtained one hour after the administration of recombinant factor VIII and measured for factor VIII activity using the factor VIII antigen ELISA. The results are outlined in the table.

	treatment	dose	recovery 1 h post treatment
mouse no.	GST-RAP	rhFVIII	FVIII:Ag (U/ml plasma)
1	40 mg/kg	200 U/kg	1,92
2	40 mg/kg	200 U/kg	1,88
2	-	200 U/kg	0,73
2	-	200 U/kg	0,83

Factor VIII recoveries in mice pretreated with GST-RAP were more than 200 % of the plasma levels following treatment with recombinant factor VIII alone.

P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Pharmazeutische Präparation zur Behandlung von Blutgerinnungsstörungen, enthaltend mindestens ein Protein, ausgesucht aus der Gruppe von einem pro-Protein der Blutgerinnung und weiters einen gerinnungsphysiologisch inerten Rezeptor-Bindungskompetitor.
2. Präparation nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das pro-Protein der Blutgerinnung ausgesucht ist aus der Gruppe von Faktor II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, vWF und Protein C.
3. Präparation nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein vWF ist.
4. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein aus einem biologischen Material ausgesucht aus der Gruppe von Humanplasma, einer Plasmafraktion und einem Zellkulturüberstand gewonnen ist.
5. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor-Bindungskompetitor ein Ligand des Lipoprotein-Rezeptor-Related-Proteins (LRP) ist.
6. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor-Bindungskompetitor RAP ist.
7. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor-Bindungskompetitor ein Gemisch aus einem gerinnungsphysiologisch aktivem Protein und dessen Inhibitor ist, insbesondere tPA und Aprotinin.
8. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Gemisch tPA und Aprotinin enthält.
9. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß es als Set zur Verfügung gestellt wird, enthaltend
 - a) das Protein und



b) den Rezeptor-Bindungskompetitor.

10. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein Faktor VIII ist und der Rezeptor-Bindungskompetitor Aprotinin, gegebenenfalls gemeinsam mit tPA.
11. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein vWF ist und der Rezeptor-Bindungskompetitor Aprotinin ist.
12. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor-Bindungskompetitor ein humanphysiologisches extrazelluläres Protein ist, oder dessen Analoges.
13. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor-Bindungskompetitor ausgewählt aus der Gruppe der Enzyme, insbesondere Tissue-type Plasminogenaktivator (tPA), Urokinase (u-PA), pro-Urokinase (pro-u-PA), Lipoproteinlipase (LPL) und Kallikrein; Inhibitoren, insbesondere Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), Tissue factor pathway Inhibitor (TFPI) und Aprotinin; Enzym-Inhibitor-Komplexe, insbesondere t-PA-PAI-1, u-PA-PAI-1 und Thrombin-PAI-1, α_2 -Macroglobulin-Proteinase (fast form) α_2M , α_2M' , Pregnancy zone protein-Proteinase, Elastase- α^1 -Antitrypsin, Thrombin-Antithrombin III, Thrombin-Heparin-Cofactor II und u-PA-Protease-Nexin I; Lipoproteine, insbesondere low density-Lipoprotein (LDL), Apolipoprotein E angereichertes β -very low density-Lipoprotein, (apo E- β -VLDL), LPL angereichertes VLDL (LPL-VLDL) und LPL angereichertes β -VLDL (LPL- β -VLDL); Matrix-Proteine, insbesondere Thrombospondin 1 und 2; Toxine und Viren, insbesondere Pseudomonas Exotoxin A, und Minor-group human Rhinovirus; oder andere Liganden, insbesondere Apolipoprotein E (apo E), Lactoferrin, Rezeptor assoziiertes Protein (RAP), FVIII und vWF, ist.
14. Kombinationspräparat enthaltend Aprotinin und tPA zur medizinischen Verwendung.
15. Verwendung eines Präparates nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung eines Patienten



mit einem phänotypischen Gerinnungsfaktor-Mangel.

16. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Patient vWF-defizient ist.

17. Verwendung eines Präparates nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Herstellung eines Mittels zur Verlängerung der biologischen Halbwertszeit des Proteins in vivo.

18. Verwendung eines Präparates nach Anspruch 17 enthaltend Aprotinin und tPA.

19. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein Blutgerinnungsfaktor VIII ist.

20. Verwendung einer pharmazeutischen Präparation eines LRP-Liganden zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung eines Patienten mit phänotypischem Gerinnungsfaktor-Mangel.

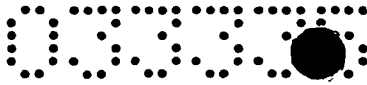
21. Verwendung eines Präparates nach Anspruch 20 enthaltend Aprotinin und tPA.

22. Verwendung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Patient vWF-defizient ist.

23. Verwendung einer pharmazeutischen Präparation eines LRP-Liganden zur Herstellung eines Mittels zur Verlängerung der biologischen Halbwertszeit eines Proteins.

24. Verwendung einer pharmazeutischen Präparation nach Anspruch 23 enthaltend Aprotinin und tPA.

25. Verwendung nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein Blutgerinnungsfaktor VIII ist.



Z u s a m m e n f a s s u n g :

Beschrieben wird eine pharmazeutische Präparation zur Behandlung von Blutgerinnungsstörungen, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie mindestens ein Protein, ausgesucht aus der Gruppe von pro-Proteinen der Blutgerinnung und weiters einen gerinnungsphysiologisch inerten Rezeptor-Bindungscompetitor enthält, sowie deren medizinische Verwendung.

Fig. 2

Effect of Aprotinin and rtPA in a vWF-deficient dog

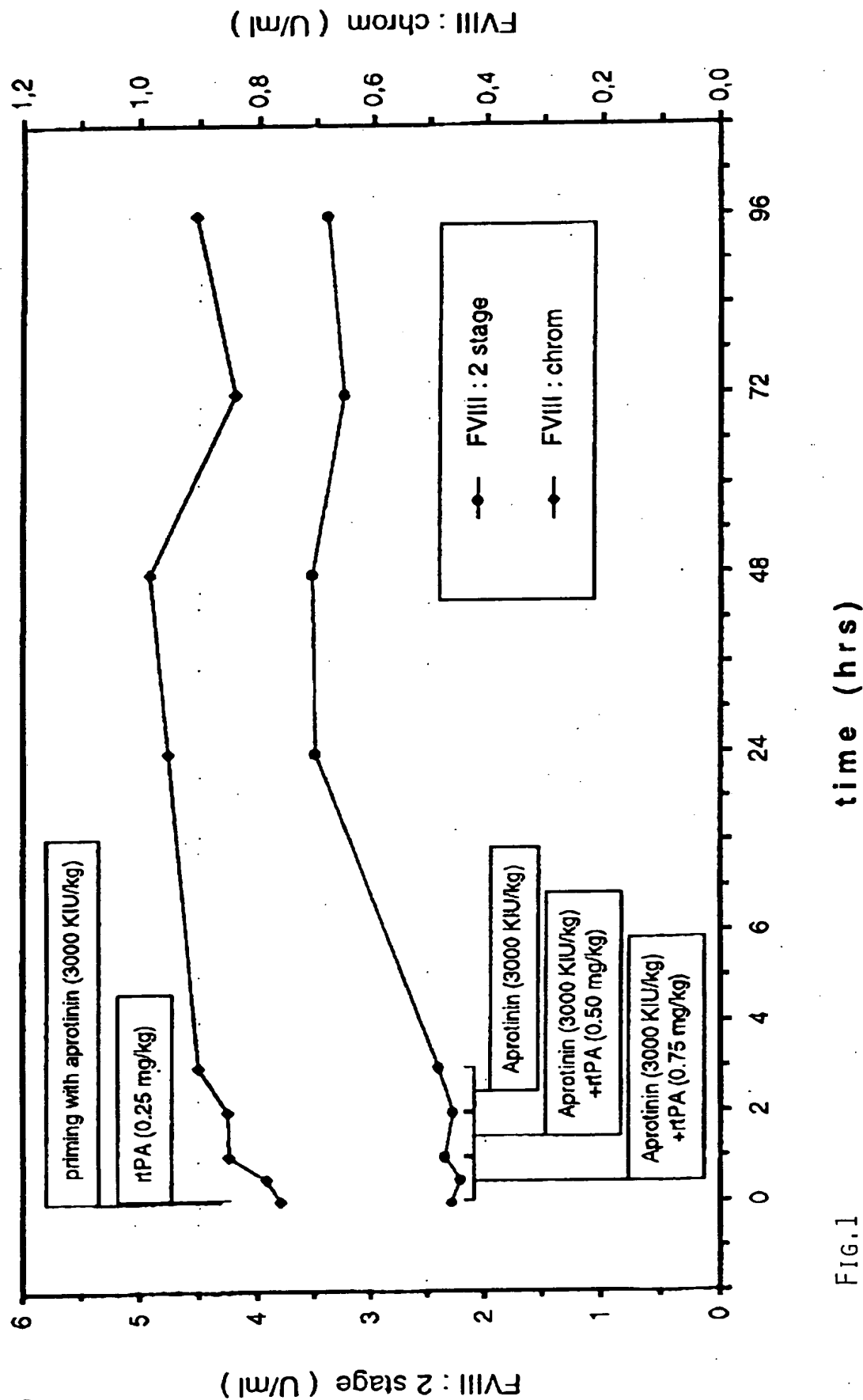


FIG.1

Effect of Aprotinin and rVWF in a vWF-deficient dog

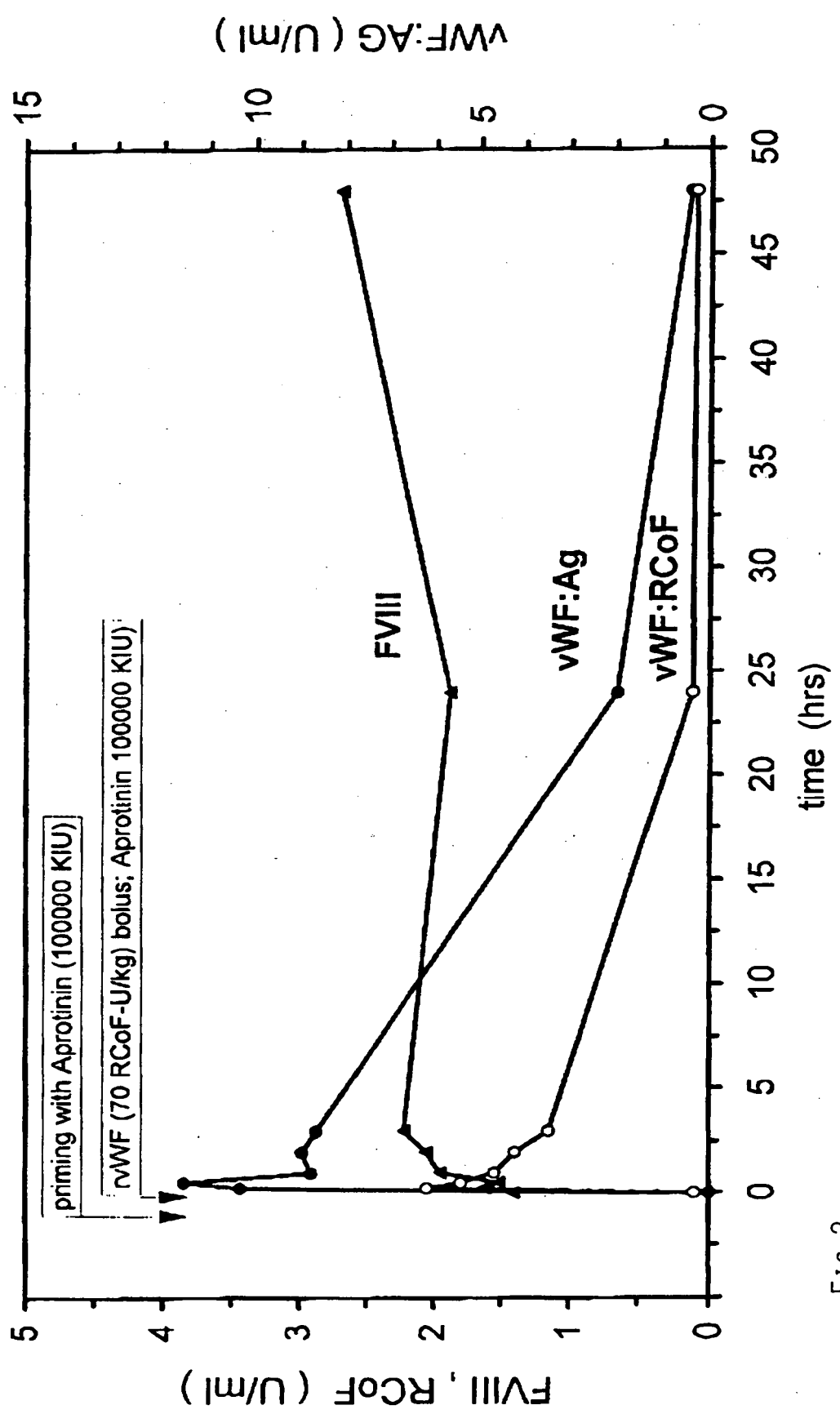


FIG.2